استخدام قواعد البيانات لتحديد مواضع القطع ورسم خارطة التقييد للجين المشفر لأنزيم اللايبيز من بكتريا *Bacillus stearothermophilus*

Using of Data Base to Determine the Restriction Sites and Drawing Restriction Map for Lipase Gene from *Bacillus stearothermophilus*

حميد مجيد جاسم

كلية العلوم / جامعة النهرين

Hameed M. Jasim

College of Science/Al-Nahrain Univsity.

استخدمت قواعد البيانات الخاصة بأنزيمات التقييد (Rebase) والبروتينات ذات العلاقة في تصميم برنامج تنفيذي بلغة Quick basic لتحديد مواضع القطع ورسم خارطة التقييد لجين اللايبيز من بكتريا *Bacillus stearothermophilus*. وقد تم التمكن باستخدام هذا البرنامج الذي يعد ذو فائدة كبيرة في التنبؤ بأنماط التقطيع لجزيئات الدنا الارتباطية من تحديد مواضع القطع الخاصة بستة عشر إنزيم من بين 46 إنزيمات التقييد المختلفة التي شملتها الدراسة. وقد أظهرت النتائج إن كل من إنزيمات التقييد *SmaI* *BclII* *BanI* *HaeII* *EcoRV* *AccI* *BspHI* *EagI* *ClaI* *DdeI* *SalI* *XhoI* *NaeI* *KspI* *SstI* *CfrI* تمتلك تسلسلات تعرفية ومواضع قطع في مناطق مختلفة من تعاقب الجين. تم تحديد تلك المواضع بدقة وحساب حجوم القطع الناتجة في حالة المعاملة بهذه الأنزيمات. من رسم خارطة التقييد لجين اللايبيز التي تبين المواضع الحساسة لإنزيمات التقييد وتحديد المنطقة المشفرة للإنزيم والبالغ حجمها 1254 زوج قاعدي ضمن التعاقب النكليوتيدي الكامل للجين البالغ حجمه 1725

Abstract

Specific data base was used for restriction enzymes (rebase) and related proteins, to design executive program in quick basic language to determine the restriction sites and drawing restriction map for the complete sequence of lipase gene from *Bacillus stearothermophilus*. This program which was of a great benefit in prediction of the restriction patterns for the analysis of recombinant DNA molecules was used to determine the restriction sites for 16 enzyme among 46 type of different restriction enzymes having recognition sequences included in lipase gene which they are *SmaI*, *XhoI*, *SalI*, *DdeI*, *ClaI*, *EagI*, *BspHI*, *AccI*, *EcoRV*, *HaeII*, *BanI*, *BclII*, *CfrI*, *SstI*, *KspI* and *NaeI*. Results showed that it could be determine accurately the restriction sites and fragments sizes resulted in case of the treatment of lipase gene with these restriction endonucleases. It was also enabled to draw restriction map specific for these enzymes and determine coding region for lipase gene sized of 1254 bp included in the complete sequence for the cDNA of the gene sized of 1725 bp.

يعرف النوع الثاني من إنزيمات التقييد بأنها تلك المجموعة من الإنزيمات التي تتميز بقابليتها على التعرف على تسلسلات خاصة ضمن جزيئات الحوامض النووية (DNA) مزدوجة الخيط وتقطع بنمط معين ضمن أو قرب ذلك التعاقب [1]. وقد عزلت أعداد كبيرة ومتنوعة من هذه الإنزيمات بلغت 3698 أنزيم تقييد منها 262 أنزيم مشخصة بدقة، وقد دونت عنها المعلومات بالكامل ضمن قواعد البيانات الخاصة بإنزيمات التقييد (Rebase) التي تضم المعلومات الكاملة عن هذه الإنزيمات من حيث التسلسل التعرفي، موضع القطع، الأنزيمات متناظرة القطع، التوافقي، الحساسية للمثيلة، بيانات التسلسل، التراكييب البلورية والحرارة المثلى لعمل الإنزيم.

كما تتضمن أيضاً أنزيمات الدنا الناقلة للمثيل (DNA methyl transferases) ، أنزيمات التلم (Nicking enzymes) وتخصص الوحدات الفرعية لهذه الأنزيمات [2، 3] . أن القابلية الدقيقة لهذه الأنزيمات على كسر جزيئات DNA سمحت بنشر وتضاعف جزيئات الـ DNA المختلفة كالبلازميدات ، العاثيات والفايروسات الحيوانية فضلاً عن وضع الخرائط الفيزيائية لمثل هذه الجزيئات [4] . وقد استخدمت بعض الجزيئات الصغيرة الحجم لتحديد التسلسل التعرفي ومواقع القطع الخاصة بهذه الأنزيمات وذلك بعد تطور التقنيات السريعة لتحديد التعاقب والتي قادت إلى تحديد التعاقب النكليوتيدي الكامل للبلازميد pBR322 [5] والفايروسات SV40 [6] و Ø X174 [7] ، حيث تم التمكن من استنباط التسلسل التعرفي ومواقع القطع لأنزيمات التقييد المكتشفة حديثاً من خلال معاملة هذه الجزيئات الصغيرة بأنزيم التقييد المراد تشخيصه بالتعرف على نمط التقطيع وحجوم القطع الناتجة بمساعدة الحاسوب [8] .

إن تصميم برنامج تنفيذي بمساعدة الحاسوب لتعيين التسلسل التعرفي ومواقع القطع لأنزيمات التقييد ضمن جزيئات الـ DNA المختلفة وتحديد حجوم القطع الناتجة من المعاملة بهذه الإنزيمات يعد ذو فائدة كبيرة لتشخيص الطفرات الوراثية التي تتعرض لها الجينات كطفرات الغرس ، الحذف أو الاستبدال لزوج قاعدي واحد أو أكثر مما يساهم في تحديد درجة التقارب الوراثي بين الكائنات الحية [9] ، كما أن مثل هذه البرامج تساعد في استنباط أنماط التقييد لجزيئات الـ DNA المنغرسه عندما يكون تسلسل نكليوتيداتها معروفاً دون الحاجة إلى استنباطها وتنقيتها [10] ، فضلاً عن مساهمته الكبيرة في دراسة أنماط التقييد ورسم الخرائط الفيزيائية (خرائط التقييد) المستقيمة والحلقية [9] ، إذ إن هذه المعلومات تعد أساساً لنجاح تجارب الاستئصال الجيني للعديد من الجينات وبشكل خاص تلك التي تشفر لنواتج حيوية مهمة للإنسان كالبروتينات المناعية والإنزيمات العلاجية كإنزيم اللايباز (3.1.1.3) الذي يحفز تفاعل التحلل المائي للكليسريدات الثلاثية ، وللإنزيم تطبيقات صناعية مختلفة في إنتاج الأحماض الدهنية الحرة وبناء الببتيدات والاسترات المفيدة [11] . وعلى هذا الأساس فقد كان الهدف من هذا البحث هو استخدام قواعد البيانات الخاصة بالنوع الثاني من إنزيمات التقييد لتصميم برنامج تنفيذي للتنبؤ بمواقع القطع وتحديد حجوم القطع الناتجة من معاملة التعاقب النكليوتيدي الكامل للدنا المشفر لإنزيم اللايباز المشتق من بكتريا *Bacillus stearothermophilus* بعدد من إنزيمات التقييد فضلاً عن رسم الخارطة الفيزيائية للجين وتحديد منطقة القراءة المفتوح (ORF) المشفرة للإنزيم ضمن التعاقب النكليوتيدي الكامل للجين .

استخدمت المعلومات الحيوية Bioinformatics لكتابة برنامج بلغة Quick basic وقد تم تكييف البرنامج ليتوافق مع التحليلات السريعة بلغة Visual basic ، شكل (1) يوضح المخطط الانسيابي للبرنامج . حيث يلاحظ من هذا الشكل بأنه قد تم تقسيم العملية التنفيذية للبرنامج إلى ثلاثة مراحل هي :

1. (Input)

أجري في هذه المرحلة إدخال التعاقب النكليوتيدي الكامل لإنزيم اللايباز المشتق من بكتريا *Bacillus stearothermophilus* والمستنبط من قبل [12] والمبين في شكل (2) ، إذ يبلغ حجم الجين 1725 زوج قاعدي يشفر لبروتين (أنزيم) مفرز خارجياً مؤلف من 417 حامض أميني ، على شكل سلسلة ببتيدية متعددة متكونة من تعاقب الإشارة (29 حامض أميني) والبروتين الفعال المؤلف من 388 حامضاً أمينياً يحفز التحلل المائي للكليسريدات الثلاثية طويلة السلسلة ، هذا ويمكن استبدال التعاقب النكليوتيدي لهذا الجين بالتسلسل النكليوتيدي الكامل لأي جزيء DNA أخرى سواء كانت بلازميدية ، كوزميدية أو كروموسومية مهما كان حجمها . كما تم إدخال المعلومات الخاصة بعدد من إنزيمات التقييد وعددها 46 نوع من أكثر إنزيمات التقييد شيوعاً واستخداماً في مختبرات البيولوجي الجزيئي ، وقد شملت هذه المعلومات التسلسل التعرفي ومواقع القطع الخاص بكل إنزيم ضمن هذه التسلسلات .

2. حسابات التقييد (Restriction calculations)

بعد إدخال المعلومات الخاصة بأنزيمات التقييد التي تمتلك تسلسلات تعريفية ضمن التعاقب النكليوتيدي الكلي البالغ 1725 زوج قاعدي للدنا المشفرة لإنزيم اللايباز والبيانات المحورة فقد تم إجراء حسابات التقييد لعدد القطع الناتجة من المعاملة بكل أنزيم وتحديد مواقع القطع ضمن التسلسل النكليوتيدي الكامل للجين و حجوم القطع الناتجة .

3. (Output)

يمكن تقسيم هذه المرحلة إلى نتائج مطبوعة ونتائج مرسومة . حيث تم طباعة مواضع الهدف الخاصة بكل أنزيم لتتبع بالمجموعة الكاملة لحجوم قطع التقييد الناتجة فضلاً عن تحديد منطقة الدنا المشفرة للإنزيم . وقد طبعت هذه النتائج بشكل تعاقبي على طول التسلسل النكليوتيدي الكامل للجين ورسمت خارطة التقييد مؤشراً عليها مواقع القطع برفقة مقياس مدرج لحجم الجين بمقدار 345 زوج قاعدي لكل تدريجه يوضح مواضع القطع ومنطقة التشفير ضمن الحجم الكلي للجين ، وأخيراً فقد صمم البرنامج ضمن هذه المرحلة ليتسنى حساب حجوم قطع التقييد الناتجة من المعاملة بكل نوع من أنزيمات التقييد .

(1) : المخطط الانسيابي للبرنامج

```

1  tgatggaacgctgccatgccagagtgcagccaccttccattgtcggcggg
51  aaacgaaatgcgcccgcacaaacatgcgcttttctcttctctcacagaa
101 aaacccgacaattgccgggattgaatcagtcggttgatatatagaata
151 tttaggtaatatgaacaaaaagattccggttatgtgagggaggagaag
201 gataggatgatgaaaggctgccgggtgatggttggtgtcgcggattatg
251 gtttggttcggcctatcggtcccgggagggcggaagcgatctc
301 cagcgccaatgatgcacccatcggtcttccatgggtttaccggatgg
351 gggcgagaggaaatgcttgattcaagtattggggcggcgtacgcggcga
401 tatcgaacaatggctgaacgacaacggatatcgaacgtatacgctggcgq
451 tcggaccgctctcgagcaactgggaccgggctgtgaagcgtacgcca
  
```

```

501 cttgtcggcggaacgggtcgattatggcgcggcccatgaggcggaacgacgg
551 ccatgcgcggtttggccgcacgtatccggggttgctgcccgaattgaaaa
601 gaggaggccggtccatcatcgccacagccaaggaggcgagacggcc
651 cgtatgcttgtctcgtcctggagaacggaagccaagaagagcgggagta
701 cgccaaggagcacaacgtgtcgttgcgcggttgtttgaaggcggacatc
751 gttttgtgttgagcgtgacgaccatcgccactcctcatgacgggacgacg
801 cttgtcaacatgggttgattttaccgatcgcttttttgacttgcaaaaagc
851 ggtgctggaagcggcggtgtcgccagcaacgcgcgtacacaagcgaaa
901 tatacgattttaagctcgaccaatgggggctgcgcgcgagccaggcgaa
951 tcgttcgaccattattttgaaaggctcaagcgctcccctgtctggacatc
1001 gaccgataccgcccgtacgattttatccgttcccggggctgagacgttga
1051 atcgatgggtgaaagccagccgaatacgattatgttgagcttttctacc
1101 gaacggacgtatcgaggagctctgacaggcaactattatcccgaacttgg
1151 aatgaacgcattcagcgcgattgtctgcgccccgtttctcggtcgtacc
1201 gcaatggcggttggcattgacagccattggcttgggaacgacggcatt
1251 gtcaataaccatttcgatgaacggtccgaagcgtggatcaaagcgtgaat
1301 cgtgccgtatgacgggacgttgaaaaaggagtttggaaatgatatgggga
1351 cgtacaaggtcgaccatttgggaagtcacggcgttgacccgaatccgtca
1401 tttatatttcgcgcctttttatgtcggttgccgagcaactggcgagttt
1451 gcggccttaaaacgagtttttgcgaaaaagccatctcgatcggtggct
1501 cttttttttgaggagcaagctcttgagttgtatgacggccgcggatgtcc
1551 gatggtataataagggaagcaagcggtgggggaatggacgtgaagcc
1601 gcctgagcgaaggaacggtatcacgtatcaagattatgtcaagtgggac
1651 ggacggtgggagctgatcaacggcgtaccttacaacatggcaccggcccc
1701 ttcatttgcctaccagtcgacgtcgc

```

(2) : التعاقب النكليوتيدي الكامل لجين اللايبير المشتق من بكتريا *Bacillus stearothermophilus* Kim وجماعته (12).

إن استخدام المعلومات الحيوية Bioinformatics التي تهتم بتطبيقات تقانة إدارة وتحليل قواعد البيانات البيولوجية لجمع وتخزين وتحليل ودمج تلك المعلومات والبيانات من خلال برامج حاسوبية يعد أمراً مهماً في استكشاف جزيئات الحياة المختلفة كالحوامض النووية والبروتينات بشكل خاص ، وعلى هذا الأساس فقد تم بناء قواعد البيانات الخاصة بكل من هذه الجزيئات مثل قواعد البيانات الخاصة بأنزيمات التقيد Restriction enzymes database التي رُصد لها موقعاً على الشبكة الدولية للمعلومات <http://rebase.neb.com/rebase.html> لتسهيل تداول جميع المعلومات الخاصة بهذه الأنزيمات [2] ، ونظراً لأهمية تحليل تعاقبات الـ DNA للبحث عن إمكانية وجود مواضع حساسة لإنزيمات التقيد [13] ، فقد تم التوجه إلى تصميم برنامج تنفيذي للتنبؤ النظري بمواضع القطع ومن ثم رسم خارطة التقيد لأي قطعة DNA مهما بلغ حجمها سواء كانت بلازميدية ، كوزميدية أو كروموسومية فضلاً عن محتواها من الجينات التركيبية والتنظيمية وذلك بعد تحديد التعاقب النكليوتيدي الكامل لهذه الجينات أو لهذه الجزيئات ، وقد صمم البرنامج ليتسنى تنفيذه باستخدام أبسط أجهزة الحاسوب المختبرية . تم إدخال التعاقب النكليوتيدي الكامل للجين المشفر لإنزيم اللايبير المشتق من بكتريا *Bacillus stearothermophilus* ، ويلاحظ من شكل (2) إن هذا الجين مؤلف من 1725 زوج قاعدي ويتكون من أربعة مناطق متميزة هي منطقة الحفاز (Promoter) بطول 207 زوج قاعدي في بداية التعاقب النكليوتيدي للجين والتي تحتوي على منطقتي 35 – (TTGATA) و 10 – (GGTAAT) اللتان تمثلان منطقتي ارتباط إنزيم الاستنساخ RNA polymerase ، ثم التعاقب الذي يمثل منطقة ارتباط الريبوسوم (RBS) قبل الشفرة البائدة لعملية الاستنساخ ATG ، ثم منطقة التشفير ORF المؤلفة من 1254 زوج قاعدي تشفر لسلسلة ببتيدية متعددة مكونة من 417 حامضاً أمينياً منها 29 حامضاً أمينياً تمثل تعاقب الإشارة Signal sequence للقائدة للإنزيم وتعاقب الإنزيم الناضج المؤلف من 388 حامضاً أمينياً . كما يلاحظ أيضاً أن منطقة التشفير تبدأ بالشفرة البائدة ATG (start codon) التي تشفر للحامض الأميني الميثيونين والتي تقع على بعد 207 زوج قاعدي من بداية تعاقب الجين وتنتهي بالشفرة الناهية للاستنساخ TAA stop codon ، وأخيراً منطقة الفاصل Terminator التي يبلغ طولها 264 زوج قاعدي وتقع في نهاية الجين . وقد أجريت عملية إدخال التعاقب النكليوتيدي الكامل للدنا المكمل للجين بواسطة الحاسوب ضمن مدخلات البرنامج الذي صمم بحيث يحتوي على المعلومات الكاملة عن 46 نوع من النوع الثاني من إنزيمات التقيد

المختلفة التي تتعرف على تسلسلات نكليوتيدية رباعية ، خماسية ، سداسية ومواقع القطع الخاصة بكل منها ضمن هذه التسلسلات ، هذا ويمكن زيادة حجم البرنامج ليعطي المعلومات الكاملة عن مواقع القطع وحجوم قطع التقييد الناتجة عن المعاملة بأكثر من 150 نوع من إنزيمات التقييد المعروفة والمخصصة بدقة في الوقت الحاضر .

وتشير النتائج التنفيذية المبينة في جدول (1) إلى إن هناك 16 إنزيم من إنزيمات التقييد المختلفة تمتلك تسلسلات تعرفيه ومواقع قطع ضمن التعاقب النكليوتيدي الكامل لجين اللابيز ، في حين أن هناك 30 إنزيم آخر من إنزيمات التقييد الأخرى التي لا تمتلك لمثل هذه التسلسلات ضمن تعاقب الجين وكما هو مبين في جدول (2) .

(1) : إنزيمات التقييد التي تمتلك تسلسلات تعريفية ومواقع قطع ضمن التعاقب النكليوتيدي الكامل لجين اللابيز المشتق من بكتريا

Bacillus stearothermophilus

أنزيم التقييد	التسلسل التعريفي	نوع النهاية
<i>SmaI</i>	CCCGGG	G ↓ C
<i>XhoI</i>	CTCGAG	T ↓ C
<i>SalI</i>	GTCGAC	G ↓ T
<i>DdeI</i>	CTNAG	T ↓ C
<i>ClaI</i>	ATCGAT	T ↓ C
<i>EagI</i>	CGGCCG	C ↓ GG
<i>BspHI</i>	TCATGA	C ↓ T
<i>AccI</i>	GTMKAC	M ↓ T
<i>EcoRV</i>	GATATC	T ↓ A
<i>HaeII</i>	RGCGCY	Y ↓ C
<i>BanI</i>	GGYRCC	G ↓ G
<i>BclI</i>	TGATCA	G ↓ T
<i>CfrI</i>	YGGCCR	Y ↓ G
<i>SstI</i>	GAGCTC	C ↓ T
<i>KspI</i>	CCGCGG	GG ↓ C
<i>NaeI</i>	GCCGGC	G ↓ C

حيث أن : N = C A = M T G = K T A = R G C = Y T

(2) : إنزيمات التقييد التي لا تمتلك تسلسلات تعريفية ومواقع قطع ضمن التعاقب النكليوتيدي الكامل لجين اللابيز

أنزيم التقييد	التسلسل التعريفي	نوع النهاية
<i>HindIII</i>	AAGCTT	A ↓ A
<i>EcoRI</i>	GAATTC	A ↓ G
<i>AhaIII</i>	TTTAAA	T ↓ A
<i>ApaI</i>	GGGCCC	CC ↓ C
<i>BamHI</i>	GGATCC	G ↓ G
<i>BglII</i>	AGATCT	G ↓ A
<i>HpaI</i>	GTTAAC	T ↓ A

A ↓C	ACGCGT	<i>MluI</i>
C ↓C	GGTACC	<i>KpnI</i>
T ↓C	GACGTC	<i>AatII</i>
TG ↓C	GCATGC	<i>SphI</i>
T ↓C	TCTAGA	<i>XbaI</i>
T ↓C	CGATCG	<i>PvuI</i>
GG ↓C	GGCGCC	<i>NarI</i>
GC ↓G	CCGCGG	<i>SacII</i>
G ↓A	CTGCAG	<i>PstI</i>
GC ↓G	TGCGCA	<i>FspI</i>
CA ↓T	CATATG	<i>NdeI</i>
T ↓C	CTTAAG	<i>AflIII</i>
T ↓A	AGTACT	<i>ScaI</i>
A ↓C	ACTAGT	<i>SpeI</i>
T ↓A	AATAAT	<i>SspI</i>
G ↓C	AGGCCT	<i>StuI</i>
C ↓C	CCTAGG	<i>AvrII</i>
C ↓G	TGCGCA	<i>FspI</i>
G ↓C	TCGCGA	<i>NruI</i>
T ↓CA	ATGCAT	<i>NsiI</i>
C ↓R	GRCGYC	<i>AcyI</i>
G ↓G	GGNCC	<i>AsuI</i>
G ↓C	CAGCTG	<i>PovII</i>

حيث أن : A = R G = Y C = T =N

المبينة في جدول (1) أن القطع بإنزيمات التقييد *SmaI* و *EcoRV* التي تتعرف على تسلسلات نكليوتيدية سداسية يعطي قطع DNA ذات نهايات مستوية في حين إن المعاملة بأنزيمات التقييد الأخرى تعطي قطع DNA ذات نهايات لاصقة . وتعد هذه النتائج مهمة في تجارب الاستئصال الجزيئي عند الحاجة لأستئصال الجين في أحد نواقل التعبير الملائمة من خلال توفر المعلومات الكاملة عن إنزيم التقييد الملائم لقطع الجين أو استئصاله ونوع النهايات الناتجة في كل حالة ليتسنى اختيار ناقل التعبير الملائم للاستئصال وطريقة الربط المناسبة [14] .
وتشير النتائج المبينة في جدول (3) إلى اختلاف تردد التسلسلات التعريفية الخاصة بإنزيمات التقييد التي تمتلك لموضع قطع ضمن التعاقب النكليوتيدي الكامل لجين اللايبز ، إذ يتردد هذا التسلسل 1 - 2 مرة وفي مواقع مختلفة مما يؤدي إلى إعطاء قطع تقييد ذات حجوم مختلفة ، فعند المعاملة بإنزيم التقييد *SmaI* الذي يمتلك موضعي قطع في مواقع مختلفة ضمن تعاقب الجين ينتج عنه ظهور ثلاثة قطع تقييد تبلغ أحجامها (273، 760 ، 692) زوج قاعدي على التوالي ، في حين يلاحظ ظهور قطعتي تقييد يبلغ حجميهما (462، 1263) زوج قاعدي على التوالي عند المعاملة بإنزيم التقييد *XhoI* الذي يمتلك موضع قطع واحد ضمن هذا التعاقب وهكذا بالنسبة لبقية إنزيمات التقييد الأخرى المبينة في جدول (3) .

(3) : مواضع القطع و حجوم القطع الناتجة من معاملة التعاقب النكليوتيدي الكامل لجين اللايبيز بأنزيمات التقييد التي تمتلك لتسلسلات تعريفية ضمن تعاقب الجين

أنزيم التقييد	حجوم القطع الناتجة (كيلو زوج) القطعة الثانية					
<i>SmaI</i>	2	273	1033	273	692	
<i>XhoI</i>	1	462	-	1263	-	
<i>SalI</i>	1	1360	-	365	-	
<i>DdeI</i>	2	1040	1640	564	121	
<i>ClaI</i>	1	1052	-	673	-	
<i>EagI</i>	1	1537	-	188	-	
<i>BspHI</i>	1	786	-	939	-	
<i>AccI</i>	1	1709	-	16	-	
<i>SacI</i>	1	1118	-	607	-	
<i>EcoRV</i>	2	400	428	28	1297	
<i>HaeII</i>	1	1209	-	516	-	
<i>BanI</i>	1	1690	-	35	-	
<i>BclI</i>	1	1665	-	60	-	
<i>CfrI</i>	2	549	564	15	1161	
<i>SstI</i>	1	1118	-	607	-	
<i>KspI</i>	1	1540	-	185	-	
<i>NaeI</i>	1	63	-	1662	-	

ومن النتائج الأخرى التي تم التوصل إليها في هذه الدراسة هو إمكانية استخدام احد إنزيمي التقييد *Sau3A* و *MboI* في بناء مكتبة الجينات الخاصة بالدنا الكروموسومي لبكتريا *Bacillus stearothermophilus* وذلك نظرا لتردد التسلسل التعرفي لهذين الإنزيمين (AGCT) 6 مرات ضمن التعاقب النكليوتيدي الكامل لجين اللايبيز بالمقارنة مع تردد التسلسل التعرفي لبقية إنزيمات التقييد الأخرى المبينة في جدول (3). لذا يعد هذان الإنزيمان ملائمان جدا في هذه العملية التي تتطلب إجراء الهضم الجزئي للدنا الكلي للجين باستخدام إنزيم تقييد يتعرف على تسلسل نيكليوتيدي رباعي يقطع في مواقع مختلفة ليعطي قطع DNA ذات نهايات مستوية يمكن غرسها في موضع إنزيم التقييد *BamHI* لنقل الاستئصال المستخدم بصورة مباشرة دون الحاجة إلى ربطها بوسائل الربط المختلفة وخاصة بالنسبة لنواقل الاستئصال المشتقة من دنا العائلي لأمدة وكما هو موصوف من قبل [15].

لذا فمن خلال هذه النتائج يمكن التنبؤ بعدد قطع التقييد الناتجة من المعاملة بأي من هذه الإنزيمات وحجم كل قطعة مهما كانت صغيرة وبالتالي التغلب على المشاكل الناجمة عن صعوبة تحديد عدد قطع التقييد الصغيرة الحجم الناتجة من هضم جزيئات الـ DNA بأنزيم التقييد الملائم ، ثم الترحيل الكهربائي للقطع الناتجة على هلام الأكاروز وذلك نظرا لصعوبة التحسس بهذه القطع الصغيرة من ناحية (وبشكل خاص تلك التي لا يزيد حجمها عن 100 زوج قاعدي) ، ولإمكانية فقدان هذه القطع بسهولة أثناء التحضير من الناحية الأخرى ، فضلا عن إمكانية ظهور القطع الصغيرة المتقاربة في الحجم على شكل حزمة واحدة بعد الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز المصبغ بصبغة بروميد الأيثيوم وكما هو موصوف من قبل [16]. ومن خلال هذه النتائج أيضا يمكن القول أنه من الممكن استخدام البرنامج الحالي لدراسة درجة التقارب الوراثي بين الأنواع المختلفة من الكائنات الحية وخاصة الحقيقية النواة من خلال تعيين درجة تماثل أطوال قطع التقييد RFLP الناجمة عن معاملة الجينات المتناظرة لهذه الكائنات بعدد من أنزيمات التقييد الملائمة ، وتعد هذه المسألة مهمة جدا لدى الباحثين في الوقت الحاضر لتعيين مدى نجاح عمليات الأستئصال الجزئي ونقل الجينات بين الأنواع المتقاربة من الكائنات الحية [17] ، إذ ينشأ التباين في أطوال قطع التقييد عن الطفرات النقطية التي تؤدي إلى حذف أو إضافة موضع تقييد وخاصة بين السلالات البكتيرية العائدة لنفس النوع [18].

وبعد تحديد عدد ونوع إنزيمات التقييد التي تمتلك لتسلسلات تعريفية ومواقع قطع ضمن التعاقب النكليوتيدي الكامل لجين اللايبيز فقد تم التمكن من رسم خارطة التقييد الخاصة بهذا الجين التي تظهر هذه المواقع على طول الجين وكما هو موضح في شكل (3). حيث يلاحظ من خلال هذا الشكل أن جين اللايبيز يمتلك موضع

حساس فريد لأنزيم التقييد *NaeI* الذي يقع على مسافة 144 زوج قاعدي قبل منطقة التشفير التي تبدأ بالشفرة البادئة ATG وتعد هذه النتيجة مهمة جدا عند الحاجة لاستئصال الجين وذلك بالمحافظة على التعاقب النكليوتيدي الكامل للمنطقة المشفرة لأنزيم اللابيز بعد المعاملة بأنزيم *NaeI* وأي من تلك الإنزيمات التي تقطع في منطقة الفاصل (*EagI* أو *KspI* أو *BclI* أو *BanI* أو *AccI*) ثم استئصال الجين في احد نواقل التعبير الملائمة بحيث يغرس تحت سيطرة أحد الحفازات القوية ليتسنى استنساخه بكفاءة عالية في مضيفه الجديد . ومن بين النتائج الأخرى التي يمكن ملاحظتها من خلال النتائج المبينة في شكل (3) أن هناك عدد كبير من أنزيمات التقييد الأخرى التي تمتلك تسلسلات تعريفه ومواضع قطع ضمن تعاقب الجين والمبينة في الجدولين (1 ، 3) لا يمكن استخدامها لاستئصال الجين نظرا لكونها تقطع مرة واحدة على الأقل ضمن التعاقب النكليوتيدي لمنطقة التشفير ، فمثلا أنزيم *SmaI* يمتلك موضعي قطع ضمن هذه المنطقة، وإنزيم *XhoI* يمتلك موضع قطع واحد ضمن نفس المنطقة ، وفي هذه الحالة لا يمكن الحصول على التعاقب النكليوتيدي الكامل لمنطقة التشفير دون حدوث أي قطع ضمنى فيها، وهذا يعني عدم إمكانية استخدام أي من هذه الإنزيمات لاستئصال الجين عند الحاجة لاستئصاله .

(3) : خارطة التقييد للتعاقب النكليوتيدي الكامل لجين اللابيز.
التشفير والمنطقتان الطرفية المفتوحة تمثلان المناطق غير المشفرة للأنزيم

من خلال ما تقدم من النتائج يتضح لنا مدى أهمية البرنامج الحالي كأداة تحليلية لدى باحثي البايولوجي الجزيئي في توفير المعلومات الكاملة عن مواضع القطع وأطوال قطع التقييد الناتجة من معاملة جزيئات الـ DNA المختلفة بأي من إنزيمات التقييد التي تمتلك تسلسلات تعريفه ضمن التعاقب النكليوتيدي الكامل لهذه الجزيئات ، فضلا عن مساهمته في تحديد درجة التقارب الوراثي بين الأنواع المختلفة من الكائنات الحية واستكشاف الطفرات الوراثية الناجمة عن حذف ، غرس أو استبدال زوج قاعدي واحد أو أكثر ضمن التتابع النكليوتيدي الكامل للجين من جهة ورسم خرائط التقييد من جهة أخرى .

References

1. Roberts, R.J. and Halford, S.E. (1993). Type II Restriction Endonucleases *In*: Nucleases, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
2. Roberts, R.J. ; Vincze, T ; Posfai, J ;and Macelis, D . (2005). REBASE – restriction enzymes and DNA methyltransferase. Nucleic Acids Research, Vol. 33, Database issue D230-D232.
3. Roberts, R.J. ; Vincze, T ; Posfai, J ;and Macelis, D . (2007). REBASE – restriction enzymes and genes for DNA restriction and modification. Nucleic Acids Research, Vol. 35, Database issue D269-D270.
4. Brown, N.L and Smith, M. (1980). *In*: Methods in Enzymology, Vol. 65, Academic press, New York, pp. 391 – 404.
5. Sutcliffe, J.G. (1979). Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. Vol. 43 , pp. 70 – 90.

6. Reddy, V.B.; Thimmappagy,B.; Dhar, R. ; Subramanian, K.N. ; Zain, B.S.; Pan, J; Ghosh, P.K.; Celma, M.L. and Weissman, S.M. (1978). Science, Vol.2, pp.494 – 502.
7. Sanger, F.;Coulson,A.R.; Friedmann,T.; Air,G.M.; Barrel,B.G.;Brown,N.L.; Fiddes, J.C.; Hutcison,C.A.;Slocombe,P.M.and Smith,M.(1978). J.Mol. Biol.Vol.125,pp .225–246.
8. Roberts,R.J. and Macelis, D. (1999). NAR Data Base Issue. Nucleic acid Res. Vol. 27, pp. 312 – 313.
9. Fuchs,D.; Rosenvold, E.; Honigman,A. and Szybalski, W.(1980). Gene, Vol. 19, pp. 225 – 246.
10. Lilly, D.M.J. (1982). A simple computer program for calculating, modifying and drawing restriction maps. Nucleic Acids Research, Vol. 10, No.1, pp. 19 – 26.
11. Dordick,J.S.(1989).Enz. Technol. Microb.11, 194-211.
12. Kim,H.K., Park,S.Y., Lee,J.K. and Oh,T.K. (1998).Gene cloning and characterization f thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1. J. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62 (1), 66-71.
13. Vineze,T.; Posfae,J. and Roberts, R.J.(2003).NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. Nucleic Acids Research, Vol.31, 3688-3691.
14. Maniatis , T.; Fritsch , E.F. and Sambrook , J.(1982) . Molecular Cloning. A laboratory manual, Cold Spring laboratory.
15. Glover, D.M.(1984) . Gene Cloning: The Mechanics of DNA Manipulation. Chapman and Hall, London, New York.
16. Tolstoshev , C.M. and Blackesley , R.W.(1982) . RSITE: a Computer Program to Predict the Recognition Sequence of a Restriction Enzyme. Nucleic Acids Research, Vol.10, No. 1, pp 1 – 18.
17. Lewin , B.(1990) . Genes II, 3rd edition, John Wiley and Sons, New York, U.S.A.
18. Dale, W.J. and Park S. F. (2004). Molecular Genetics of Bacteria, 4rd. Edition, John Wiley and Sons Ltd. West Sussex, England.